

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren: Prof. Dr. H. J. Dengler
Prof. Dr. H. A. Kühn
Prof. Dr. H. G. Lasch

**CYTOSTATISCHE WIRKUNGEN
VERSCHIEDENER ZUCKER AUF
EHRlich-ASCITES-TUMORZELLEN IN VITRO**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Ortger Krantz
aus Darmstadt

Gießen 1970

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren: Prof. Dr. H. J. Dengler
Prof. Dr. H. A. Kühn
Prof. Dr. H. G. Lasch

**CYTOSTATISCHE WIRKUNGEN
VERSCHIEDENER ZUCKER AUF
EHRlich-ASCITES-TUMORZELLEN IN VITRO**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Ortger Krantz
aus Darmstadt

Gießen 1970



Dekan: Prof. Dr. H. Rettig
Referent: Prof. Dr. H. A. Kühn
Correferent: Prof. Dr. E. R. Habermann

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS :

Seite

I EINLEITUNG	4
--------------------	---

II MATERIAL UND METHODEN

A. Material :

1. Ehrlich-Ascites-Tumorzellen	6
2. Radioaktive Substanzen	6

B. Methoden :

1. Gewinnung der Ehrlich-Ascites-Tumorzellen	6
2. Radioaktivitätsmessung	7
3a. NAD-Synthese	8
b. NAD-Synthese mit Vorinkubation	10
4. DNS-Synthese	11
5. Proteinsynthese	12
6. Glucose-Gehalt	12
7. Hexosaminbestimmung	12
8. ATP-Gehalt	13
9. Transplantation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen	13
10. pH-Messung	13

III ERGEBNISSE :

A. Cytostatische Wirkung von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die NAD-Synthese und Transplantierbarkeit von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Vorinkubation	14
B. Hemmung der NAD-Synthese bei niedriger Glucosekonzentration	23
C. Einfluss verschiedener Zucker auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ	26

D. Einfluss von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf Human- Leukozyten, Vogel-Erythrozyten und Ratten- leberschnitten	42
IV DISKUSSION	45
V ZUSAMMENFASSUNG	51
VI LITERATURVERZEICHNIS	53
VII LEBENSLAUF	58

I EINLEITUNG

In einer vorhergehenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ehrlich-Ascites-Tumorzellen während einer Inkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine erhebliche Einschränkung ihrer Syntheseleistungen erfahren (3).

Besonders untersucht wurden hierbei die NAD-, DNS- und Proteinsynthese. Ein genereller cytostatischer Effekt liess sich zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisen, da die mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vorbehandelten Zellen in gleicher Weise transplantierbar waren wie die Kontrollen. Da bei einer deutlich ausgeprägten Hemmung der oben angegebenen Synthesen eine cytostatische Wirkung angenommen werden musste, wurde in der vorliegenden Arbeit dieser Frage nach dem cytostatischen Effekt durch die Kombination Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ weiter nachgegangen.

Die Untersuchungen wurden zudem auf andere Zucker ausgedehnt, da die Möglichkeit bestand, dass andere Zucker eine stärker ausgeprägte cytostatische Wirkung auf EATZ ausüben könnten wie in den Voruntersuchungen seitens der Glucose beschrieben wurde. Im einzelnen wurden folgende Fragen experimentell untersucht:

1. Lässt sich ein cytostatischer Effekt von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in vitro nachweisen ?
2. Ist durch vorläufige Untersuchungen zu entscheiden, ob Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ diesen

cytostatischen Effekt bewirken ?

3. Lässt sich auch bei anderen Zuckern ein entsprechender Effekt nachweisen ?
4. Ist die cytostatische Wirkung tumorspezifisch oder reagieren auch normale Gewebe in ähnlicher Weise ?

Als Mass für die cytostatische Wirkung in vitro wurde die Hemmung der NAD-, DNS- und Proteinsynthese angesehen, wobei die NAD-Synthese als Suchtest galt und weiterführende Untersuchungen nur dann angestellt wurden, wenn diese Synthese deutlich gehemmt war. Die Versuchsergebnisse in vitro wurden abschliessend mit Transplantationsversuchen in vivo korreliert.

In der Arbeit verwandte Abkürzungen :

ATP = Adenosintriphosphat

2-DOG = 2-Desoxy-D-glucose

dpm = desintegrations per minute

EATZ = Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

IpM = Impulse pro Minute

KRB = Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer

NAD = Nikotinsäureamidadenindinucleotid

NSAD = Nikotinsäureadenindinucleotid

POPOP = 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol

PPO = 2,5-Diphenyloxazol

UPM = Umdrehungen pro Minute

II MATERIAL UND METHODEN

A. 1. Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Holzer, Direktor des Biochemischen Instituts und Herrn Prof. Dr. Sandritter, Direktor des Pathologischen Instituts der Universität Freiburg i. Breisgau, (früher Direktor des Pathologischen Instituts der Justus Liebig-Universität Giessen), zur Verfügung gestellt und auf 20 - 25 g schweren männlichen Albinomäusen vom Stamm NMRI, Versuchstieranstalt Hannover, weitergezüchtet.

2. Die verwandten radioaktiven Substanzen
 ^{14}C -7-Nikotinsäure (spez. Aktivität 27,9 mC/m Mol)
 ^{14}C -2-Thymidin (spez. Aktivität 60,5 mC/m Mol) und
 ^{14}C -L-Leucin (spez. Aktivität 6,6 und 10 mC/m Mol)
wurden von der Firma Buchler u. Co., Braunschweig bezogen.

B. 1. Gewinnung der Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Die Tumorzellen wurden 8 - 10 Tage nach Inokulation den Mäusen nach cerebraler Dislokation entnommen, zur Gerinnungshemmung Heparinlösung (Liquimin^R) im Verhältnis 1:100 zugesetzt, zur Abtrennung grober Verunreinigungen wurde der Ascites durch Gaze filtriert und durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 1200 UPM (Laborzentrifuge "Fixette" der Firma Christ) von Erythrozyten befreit, wobei jeweils mit Krebs-Ringer-Bikarbonat-

puffer pH 7,4 aufgeschwemmt wurde. Der Zellgehalt wurde anschliessend mit Eiweissrelationsröhrchen nach Kafka und Samson bestimmt.

2. Radioaktivitätsmessung.

Verwandtes Scintillatorgemisch:

Thix-Gel-Scintillator mit folgender Zusammensetzung:

1800 ml Dioxan, 200 ml Äthanol,
252 g Naphthalin, 115 g Gab-O-Sil,
14 g PPO und 360 g POPOP.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Tri-Carb-Scintillation-Counter Modell Nr.3375.

Die Quenchkorrektur erfolgte mit Hilfe eines externen Standards.

3a. NAD-Synthese

Als NAD-Synthese wurde der Einbau von 14-C-7-Nikotinsäure in die Pyridinnukleotide NSAD und NAD gewertet. Dabei ist zu bemerken, dass normalerweise als NAD-Synthese nur die Messung der Zunahme der spez. Aktivität des NAD gewertet werden darf. Dieses Verfahren würde aber einerseits die elektrophoretische Auftrennung der beiden Nukleotide NSAD und NAD voraussetzen und zum anderen insofern von Nachteil sein, als einige Kontrollansätze ohne NH_4^+ -Quelle inkubiert werden mussten, was einen Aufstau von NSAD zur Folge haben würde. Da die Hemmung der NAD-Synthese in unseren Versuchen überwiegend die NSMN-Bildung betraf, wurde der 14-C-7-Nikotinsäureeinbau in die NSAD und NAD-Fraktion als Ausdruck der NAD-Syntheseleistung angesehen.

Die Inkubation erfolgte in kleinen (ca 15 ml Volumen) kastenförmigen Warburggefäßen. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 5,0 ml, wobei der Hauptraum mit Ehrlich-Ascites-Tumorzellsuspension, hitzeinaktiviertem Ascitesserum, 0,1 M Ammoniumsulfatlösung, 1/4 molarer Monosaccharidlösung oder anderer zuckerähnlicher Substanzen, 0,7 μC 14-C-7-Nikotinsäurelösung und Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung beschickt wurden. Nach Einhängen

der Gefässe in die Warburg-Apparatur (Fa.Braun; Melsungen) bei einer Temperatur von 37°C wurde 1 Std. unter Schütteln inkubiert und mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 bei leichtem Druck begast.

Der Standardversuchsansatz enthielt 0,1 ml Tumorzellen, 0,5 ml Ascitessserum, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung entsprechend einer Endkonzentration von 10^{-2}M , $0,7\text{ }\mu\text{C}$ 14-C-7-Nikotinsäure in einer EK von $5 \times 10^{-6}\text{M}$, Monosaccharide und ähnliche Substanzen in einer EK von $5 \times 10^{-2}\text{M}$ und KRB pH 7,4 ad 5,0 .

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze quantitativ in Zentrifugengläser überführt und 1 min bei 5000 UPM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig mit einer Cavillare abgesaugt und das Zellsediment mit 1,5 ml $0,6\text{ n HClO}_4$ bei 0°C aufgeschlossen und anschliessend 10 min bei 0°C gehalten. Nach 10 min Zentrifugieren bei 5000 UPM und 4°C wurden zu 1,0 ml des zellfreien Überstandes 2 mg ATP und 8 ml auf -18°C gekühltes Aceton in einem Zentrifugenglas zugesetzt und mit einem Glasstab an der Innenwand solange gerieben, bis eine gut sichtbare flockige Fällung auftrat. Nach 12-stündigem Stehenlassen bei -18°C zur vollständigen Ausfällung der Nukleotide wurde 2 Std. bei 5000 UPM und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment je 1x mit Aceton und Äther

gewaschen und in 1,0 ml Aqua dest. gelöst.

3b. NAD-Synthese mit Vorinkubation

Wurde die NAD-Synthese nach Vorinkubation gemessen, so enthielten in der Vorinkubationszeit die Ansätze im Hauptraum der Warburggefäße (ca 23 ml Volumen) 0,05 bis 0,5 ml Tumorzellen, 0,75 ml hitze-inaktiviertes Ascitessserum, 5 % Glucoselösung in einer EK von $5 \times 10^{-2} \text{M}$, $10^{-2} \text{M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und mit KRB wurde auf Volumen von 7,5 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden 2 Std in der Warburg-Apparatur inkubiert und mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 bei leichtem Druck begast. Nach Ablauf der Vorinkubation wurden die Ansätze quantitativ in Zentrifugengläser überführt, 2 min bei 1200 UPM zentrifugiert, 1x mit KRB gewaschen und erneut nach Bestimmung der Zellzahl inkubiert und begast. Die Ansätze enthielten nun 0,1 ml Tumorzellen, 0,5 ml Ascitessserum, 0,7 μC 14-C-7-Nikotinsäure in einer EK von $5 \times 10^{-6} \text{M}$ und KRB ad 5,0 ml. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie in 3a beschrieben.

4. DNS-Synthese

Als Mass für die DNS-Synthese wurde der 14-C-2-Thymidin-Einbau in die perchlorsäureunlösliche Zellfraktion gewertet (26). Die Versuchsansätze unterscheiden sich von den Ansätzen zur Messung der NAD-Synthese nur dadurch, dass der Hauptraum der Warburggefässe 2 μ C 14-C-2-Thymidinlösung und inaktive Thymidinlösung (EK 5×10^{-6} M) enthielten, bei sonst gleichen Inkubationsbedingungen.

Das Aufschliessen der Ehrlich-Ascites-Tumorzellen erfolgte mit 2,0 ml 0,6 n HClO_4 von 0°C und 3 maligem Waschen in eiskalter 0,6 n HClO_4 . Dem Zellsediment wurde 1 ml 0,6 n HClO_4 zugesetzt und die DNS-Fraktion 1 Std. bei 80°C im Wasserbad extrahiert. Anschliessend wurde 5 min bei 5000 UPM zentrifugiert, der Überstand quantitativ abgegossen und zu 0,2 ml dieses Überstandes wurden 10 ml Thix-Gel-Scintillator zugesetzt.

5. Protein-Synthese

Als Mass für die Proteinsynthese wurde der Einbau von 14-C-L-Leucin in die perchlorsäureunlösliche Zellfraktion gewertet (2,5,27). Die Versuchsansätze wurden im Unterschied zur NAD- und DNS-Synthese mit 0,5 μ C 14-C-L-Leucin (EK 10^{-5} M) und einer inaktiven Leucinlösung (EK 10^{-4} M) unter sonst gleichen Inkubationsbedingungen inkubiert.

Das Aufschliessen der EATZ erfolgte wie bei der DNS-Synthese beschrieben. Das dort gewonnene Zellsediment wird 2x mit 5 ml 0,6 n HClO₄ von 0°C gewaschen. Das Trocknen des Sediments erfolgte durch je 5 ml Äthanol und Äther. Anschliessend wurde das luftgetrocknete Sediment in 1 ml konz. Ameisensäure gelöst und zu 0,2 ml dieser Lösung wurde 10 ml Thix-Gel-Scintillator zugesetzt.

6. Glucose-Gehalt

Die Glucose-Konzentration wurde nach der jeweiligen Inkubation im zellfreien Überstand mit dem Farb-Test TC-M-II 15983 Boehringer, Mannheim, bestimmt.

7. Hexosaminbestimmung

Die Bestimmung der Glucosaminkonzentration erfolgte nach MORGAN und ELSON (21).

8. ATP-Gehalt

Der ATP-Gehalt wurde mit dem ATP-UV-Test TC-J 15979 Boehringer, Mannheim bestimmt.

9. Transplantierbarkeit von EATZ

Alle Inkubationsansätze enthielten ca 1,3 ml Tumorzellen, 0,75 ml Ascitessserum, 10^{-2}M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, jeweils 1,5 ml $1/4 \text{ M}$ Monosaccharide oder ähnliche Substanzen und mit KRB wurde auf ein Volumen von 7,5 ml aufgefüllt, 2 Std in der Warburg-Apparatur inkubiert und begast. Abschliessend wurden die Zellen quantitativ in Zentrifugengläser überführt, 2 min bei 1200 UPM zentrifugiert, 2x mit KRB gewaschen und in 5 ml KRB resuspendiert.

Jeweils 10 Tiere wurden mit 0,5 ml der Tumorzellsuspension intraperitoneal beimpft. Beobachtet wurde die Überlebenszeit der Mäuse und nach 21 Tagen wurden alle noch lebenden Tiere getötet und auf Ascites untersucht.

10. pH-Messung

Um einen pH-Effekt der auf ihre cytostatische Wirkung untersuchten Substanzen auszuschliessen, wurden die pH-Werte jeweils vor und nach der Inkubation im abzentrifugierten Überstand mit einem Labor-pH-Meter der Firma Knick gemessen.

Einzelheiten finden sich in den Legenden zu den entsprechenden Abbildungen und Tabellen im Text.

III ERGEBNISSE

- A. Cytostatische Wirkung von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die NAD-Synthese und Transplantierbarkeit von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Vorinkubation.

In der bereits zitierten Arbeit (3), die den jetzigen Versuchen voranging, liess sich zwar durch die Inkubation von EATZ mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine Hemmung der NAD-, DNS- und Proteinsynthese nachweisen ; eine vollständige cytostatische Wirkung konnte jedoch nicht erzielt werden, da die Zellen transplantierbar blieben. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob die Hemmung der NAD-Synthese durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ reversibel ist oder nicht.

Die ABB. 1 zeigt den entsprechenden Versuch. Nach Vorinkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ werden die Zellen in ein frisches Medium resuspendiert und die NAD-Synthese durch Einbau von 14-C-Nikotinsäure in NSAD + NAD gemessen. Wie aus ABB.1 deutlich hervorgeht, ist nach Vorinkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die Hemmung der NAD-Synthese nur in den ersten 30 min nach Resuspendierung nachweisbar, danach verläuft die NAD-Synthese wie die der unbehandelten Kontrolle, und wie TAB.I. zeigt, blieben die Zellen wiederum transplantierbar.

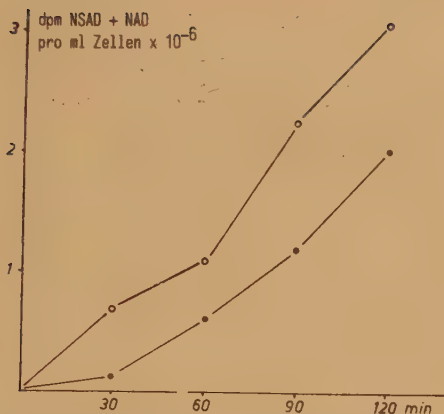


ABB.1 Zeitlicher Ablauf des 14-C-7-Nikotinsäure-Einbaus in NSAD + NAD nach Vorinkubation unter Kontrollbedingungen und mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Ansätze enthielten in der Vorinkubation 0,45 ml Zellen, 10 mg/ml Glucose, 0,75 ml inaktiviertes Ascitesserum, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einer EK von 10^{-2}M und KRB ad 7,5 ml. Die Kontrollansätze enthielten keine Glucose und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nach Ablauf der 2-stündigen Vorinkubation wurden die Ansätze zentrifugiert (2 min bei 1200 UPM), die Zellen in KRB resuspendiert und erneut inkubiert. Die Ansätze entsprachen nun dem Standardversuchsansatz, wie er in METHODEN beschrieben wurde. Kontrolle o - o ; + Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

• - • .

Inkubations- bedingungen	ml Zellen pro ml Ansatz	Überimpferfolg
Kontrolle	0,04	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet
Glucose $5,4 \times 10^{-2} M$ $+(NH_4)_2SO_4$ $10^{-2} M$	0,04	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet

TAB.I Ergebnis eines Transplantationsversuches an jeweils 10 Tieren zu dem in ABB.1 gezeigten Versuch. Versuchsbedingungen und Weiterbehandlung der Zellen siehe Methodik.

Da der von den Mäusen zu diesem Zeitpunkt gewonnene Ascites ausserordentlich schleimbildend war, lag die Vorstellung einer Mutation dieser Zellen nahe. Die Untersuchungen wurden deshalb an einem frischen Tumortransplantat wiederholt, welches uns freundlicherweise von Prof.Sandritter zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Tumor wuchs ohne Schleimbildung.

Mit diesem Tumor wurde der gleiche Versuch wie in ABB.1 wiederholt und wie aus ABB.2 zu ersehen ist, ergibt sich nunmehr eine irreversible Hemmung der NAD-Synthese über 3 Stunden.

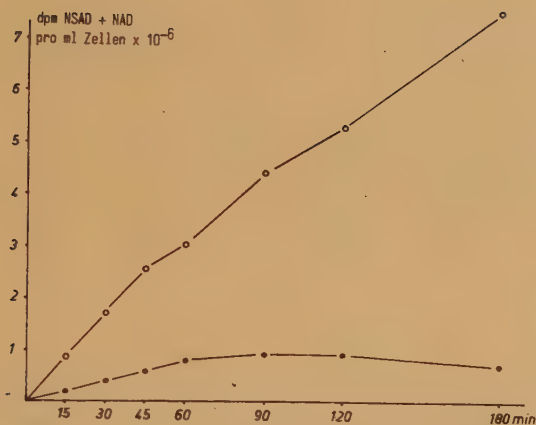


ABB.2 Zeitlicher Ablauf des 14-C-7-Nikotinsäure-Einbaus in NSAD + NAD unter Kontrollbedingungen und mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Werte ergeben sich als Mittelwerte aus 2⁴ Versüchen. Die Ansätze enthielten in der Vorinkubation 1,40 ml Zellen, 10 mg/ml Glucose, 0,75 ml inaktiviertes Ascitesserum, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einer EK von 10^{-2}M , und mit KRB wurde auf ein Volumen von 7,5 ml aufgefüllt. Die weiteren Versuchsbedingungen sind aus der Legende zu ABB.1 zu ersehen.
Kontrolle o - o; + Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ • - • .

ABB.3 zeigt zusätzlich, dass die Zellkonzentration im Ansatz für die Vorinkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nicht zu niedrig gewählt werden darf, da sich sonst nur eine zwar irreversible aber geringere Hemmung der NAD-Synthese nachweisen lässt.

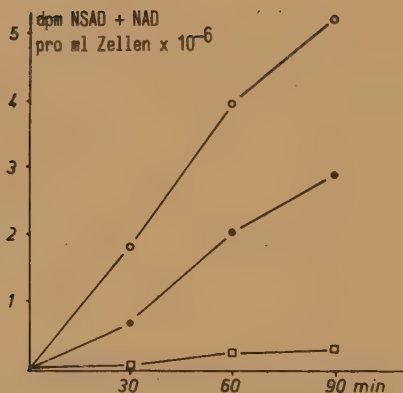


ABB.3 Zeitlicher Ablauf des $^{14}\text{-C-7}$ -Nikontinsäure-Einbaus in NSAD + NAD nach Vorinkubation unter Kontrollbedingungen und mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei verschiedenen Zellkonzentrationen im Ansatz. Die Kontrollwerte ergeben sich als Mittelwerte aus 2 Versuchen. Die Ansätze enthielten bei der 2-stündigen Vorinkubation jeweils 0,22 ml Zellen/ml Ansatz und 0,05 ml Zellen/ml Ansatz, 10 mg/ml Glucose, 0,5 ml inaktiviertes Ascitesserum, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10^{-2}M), und KRB ad 5,0 ml. Die Kontrollansätze enthielten 0,14 ml Zellen/ml Ansatz (Mittelwert aus hoher und niedriger Zellkonz.). Die weiteren Versuchsbedingungen siehe Legende zu ABB.1 Kontrolle ○ - ○ ; + Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,05 ml Zellen/ml) ● - ●; + Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,22 ml Zellen/ml) □ - □.

TAB.II zeigt den entsprechenden Überimpfversuch zu den ABB.2 und ABB.3. Unter Kontrollbedingungen bei der Vorinkubation sterben alle überimpften Tiere und dies ist ebenso der Fall, wenn die Vorinkubation mit nur geringer Zellkonzentration durchgeführt wird. Wird eine Zellkonzentration von $>0,1$ ml Zellen/ml Ansatz in der Vorinkubation gewählt, sind die Zellen nicht mehr transplantierbar.

Inkubations- bedingungen	ml Zellen pro ml Ansatz	Überimpferfolg
Kontrolle	0,026 0,053 0,147 0,173 0,187	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet
Glucose $5 \times 10^{-2} M$ $+(NH_4)_2SO_4 \cdot 10^{-2} M$	0,026 0,053	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet
	0,147 0,173 0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites

TAB.II Transplantationsversuch mit verschiedener Zellkonzentration pro ml Ansatz, entsprechend den Versuchen zu ABB.2 und ABB.3.

Auf Grund dieser Untersuchungen wurden alle später ausgeführten Versuche mit dem frischen Tumor durchgeführt; in den Untersuchungen, in denen die Transplantierbarkeit der Zellen geprüft wurde, ist eine hohe Zellkonzentration gewählt worden.

In den vorangehenden Versuchen ist ein cytostatischer Effekt von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Inkubationsmedium stärker nachweisbar, wenn eine hohe Zellkonzentration im Ansatz gewählt wurde. Eine der Ursachen für diesen Effekt könnte die Synthese eines hemmenden Metaboliten sein. Es wurde deshalb als nächstes geprüft, ob eine Hemmung der NAD-Synthese bereits kurz nach Inkubationsbeginn nachweisbar ist.

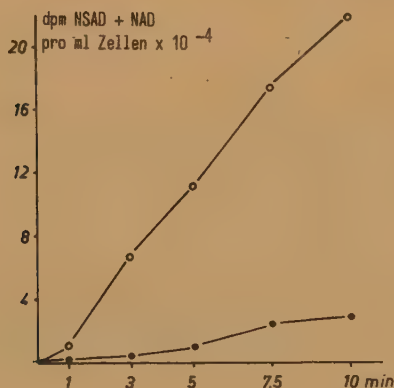


ABB.4 Zeitlicher Ablauf des 14-C-7-Nikotinsäure-Einbaus in NSAD + NAD unter Kontrollbedingungen und mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Ansätze enthielten 0,05 ml Zellen, 10 mg/ml Glucose, 0,15 ml inaktiviertes Ascitesserum, 0,5 μC 14-C-7-NS ($1,2 \times 10^{-7}\text{M}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10^{-2}M), und mit KRB wurde auf ein Volumen von 1,5 ml aufgefüllt. Die Kontrolle enthielt keine Glucose und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Versuch durch Zugabe von 0,3 ml 2n HClO_4 direkt in den Ansatz gestoppt. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie in der Methodik beschrieben. Kontrolle o - o; + Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

• - • .

Dauer der Vor- inkub. mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in min	dpm NSAD+NAD pro ml Zellen $\times \text{Std.} \times 10^{-5}$	% der Kontrolle	Glucose-Konz. im Ansatz der Vorinkubation in mg%
0	3,49	--	--
15	1,07	48,0	997
30	1,53	43,8	1028
45	1,41	40,5	808
60	1,09	31,3	718
75	1,31	37,4	681
90	1,34	38,4	612
105	1,38	39,7	592
120	1,10	31,6	588

TAB.III NSAD + NAD-Synthese in EATZ nach verschieden langer Vorinkubation in einem Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthaltendem Medium. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen in ein nicht hemmendes Medium resuspendiert und der 14-C-7-NS-Einbau gemessen. Gleichzeitig wurde die Glucosekonzentration in dem hemmenden Medium fortlaufend bestimmt. Die Ansätze enthielten in der Vorinkubation 0,1 ml Zellen/ml Ansatz, 10 mg/ml Glucose, 0,1 ml inaktiviertes Ascitessserum pro ml Ansatz und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einer EK von 10^{-2}M . Nach Ablauf der jeweiligen Vorinkubationszeit wurden die Überstände bei 1200 UPM abzentrifugiert, die Zellen resuspendiert und erneut inkubiert. Die neuen Ansätze enthielten 0,1 ml Zellen, 0,2 ml Ascitessserum, 0,7 μC 14-C-7-NS in einer EK von $9,0 \times 10^{-6}\text{M}$ und KRB ad 2,0 ml. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte wie in METHODEN beschrieben.

Wie ABB. 4 zeigt ist die NAD-Synthesehemmung unter Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bereits 60 sec nach Inkubationsbeginn deutlich nachweisbar, eine noch kürzere zeitliche Differenzierung musste aus messtechnischen Gründen unterbleiben. Eine Lag-Phase bis zur Ausbildung der Hemmung lässt sich in diesem Kurzzeitversuch nicht nachweisen.

Ein ergänzend durchgeführter Versuch (TAB.III) zeigt, dass das Ausmass der Hemmung der NAD-Synthese nach Vorinkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nicht wesentlich von der Dauer der Vorinkubation abhängig ist. Bereits nach 15 min Vorinkubation und anschließender Resuspendierung in ein neutrales Medium ist eine deutliche Hemmung der NAD-Synthese nachweisbar, die sich mit Verlängerung der Vorinkubationszeit nur unwesentlich verstärkt. Die Kontrolle der Glucosekonzentration ergibt dabei, dass die Zellen während der Vorinkubation fortlaufend Glucose verbrauchen. Wie in den früheren Versuchen gezeigt werden konnte, wurde die Atmung und Glykolyse der EATZ durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nicht beeinträchtigt (3).

B. Hemmung der NAD-Synthese bei niedriger Glucose Konzentration.

Dass die Glucose nicht ohne weiteres als hemmender Faktor angesehen werden kann, ergibt sich aus dem nächsten Versuch. Ein bereits für eine 2-stündige Vorinkubation verwendetes Medium, dessen Glucosekonzentration von 1000 mg% auf 600 mg% gesenkt worden war, zeigt nach weiterer Vorinkubation mit EATZ und Senkung des Glucose-Spiegels auf 300 mg%, den gleichen hemmenden Einfluss (TAB.IV).

Glucose-Konz. nach 2-stünd. Vorinkubation im Medium in mg%	n	% der Kontrolle
1000 - 600	2	6,52
300	2	4,52

TAB.IV NSAD+NAD-Synthese von EATZ bei verschiedener Glucosekonzentration in einem hemmenden Überstand. Als hemmender Überstand wurde ein Medium benutzt, welches bereits in einem vorhergehenden Versuch durch eine 2-stündige Inkubation mit EATZ entstanden war. Nach der jeweiligen Vorinkubation wurden die Zellen in ein frisches Medium resuspendiert und der 14-C-7-NS-Einbau gemessen. Gleichzeitig wurde die Glucosekonzentration in dem hemmenden Inkubationsmedium bestimmt. Die Ansätze in der Vorinkubation enthielten 0,1 ml Zellen/ml Ansatz und 1,0 ml hemmenden Überstand/ml Ansatz. Die weiteren Versuchsbedingungen entsprachen den in Legende zu TAB.III beschriebenen Versuchen.

Dies wird noch durch einen weiteren in TAB.V dargestellten Versuch bestätigt. Setzt man einen Überstand, dessen Glucosekonzentration durch Vorinkubation mit EATZ von ca 800 mg% auf ca 300 mg% gesenkt worden war, direkt einem Inkubationsansatz zu, so ist die Hemmung der NAD-Synthese durch den Überstand mit der geringeren Glucosekonzentration grösser.

Versuch	n	hemmender Überstand in ml	Glucose-Konz. im Medium in mg%	dpm NSAD+NAD pro ml Zellen $\times$ Std. $\times 10^{-5}$	% der Kontrolle
Kontrolle	1	-	-	2,85	-
I Glucose-Konz. im Überstand 840 mg%	2	0,2	67,2	1,67	58,6
	2	0,5	168	1,19	41,9
II Glucose-Konz. im Überstand 370 mg%	3	0,2	29,6	1,54	53,9
	3	0,5	74,0	1,12	39,2

TAB.V Einfluss hemmender Überstände auf die NSAD + NAD-Synthese. In Versuch I wurde ein hemmender Überstand eingesetzt, der durch eine vorausgehende Inkubation mit EATZ von einer Glucosekonzentration von 1000 mg% auf 840 mg% gesenkt worden war. In Versuch II wurde ein hemmender Überstand eingesetzt, der durch Inkubation mit EATZ von 1000 mg% auf 370 mg% Glucose gesenkt worden war. Die Ansätze enthielten 0,033 ml Zellen, 0,25 ml Ascitessserum, den jeweils in der Tabelle angegebenen hemmenden Überstand, 0,5 μ C 14-C-7-NS in einer EK von $7,2 \times 10^{-6}$ M und KRB ad 2,5 ml Volumen. Nach 60 min wurden die Zellen abzentrifugiert und die NAD-Synthese durch HClO_4 - Zugabe gestoppt.

TAB.VI zeigt, dass der hemmende Faktor hitzestabil ist. Setzt man einem Inkubationsansatz gekochten oder ungekochten Überstand zu, so hat der gekochte Überstand die gleiche Hemmwirkung auf die NAD-Synthese wie der ungekochte.

Inkubations- bedingungen	n	dpm NSAD+NAD pro ml Zellen x Std. x 10 ⁻⁵	% der Kontrolle
Kontrolle	4	2,94	-
Glucose +(NH ₄) ₂ SO ₄	4	0,58	19,7
hemmender Überstand	4	2,28	77,8
hemmender Überstand 15 min auf 100°C erhitzt	4	1,63	55,4

TAB.VI Einfluss eines erhitzten und nicht erhitzten hemmenden Überstandes auf die NAD-Synthese von EATZ. Die Inkubationsansätze enthielten 0,03 ml Zellen/ml Ansatz, 0,1 ml Ascitessserum/ml Ansatz, jeweils 0,4 ml/ml Ansatz eines erhitzten und nicht erhitzten Überstandes, der durch vorausgegangene 4-stündige Inkubation in EATZ gewonnen wurde. Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen den Standardbedingungen. Die Kontrolle enthielt (NH₄)₂SO₄. Die NAD-Synthese wurde durch direkte Zugabe von 1,3 ml 2 n HClO₄ in den Ansatz gestoppt.

C. Einfluss verschiedener Zucker auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ.

Aus den bisherigen Untersuchungen ergibt sich die Frage, ob nur Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ den beobachteten cyto statischen Effekt auslösen kann, oder ob auch andere Zucker in Kombination mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die Glucose in ihrer Wirkung ersetzen können.

TAB.VII - X ergeben zunächst eine Übersicht der geprüften Zucker, zuckerähnlichen Substanzen und Stoffwechselprodukte.

Inkubationsbedingungen	n	% der Kontrolle		
		NAD-Synthese	DNS-Synthese	Protein-Synthese
D(+)-Glucose	17	14,04	14,2	10,1
D(-)-Fructose	4	24,45	21,7	9,9
D - Mannose	2	7,1	4,64	4,3
D(+)-Galaktose	3	163,8	118,3	104,8
L - Sorbose	2	154,4	108,0	108,6
Methyl- α -D-pyranosid	5	117,4	123,8	90,2
3-O-Methyl-D-pyranose	1	77,7	-	-
2-Desoxy-D-glucose (10^{-2}M)	1	2,0	-	-
meso-Inosit	2	119,5	+	-
D(-)-Sorbit	3	142,8	-	-
D(-)-Mannit	2	116,8	-	-
Maltose	3	186,0	94,1	62,5

TAB.VII Einfluss verschiedener Zucker auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ. Die Inkubationsansätze enthielten 0,1 ml Zellen, 0,5 ml inaktiviertes Ascitesserum, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10^{-2}M), Zucker in einer EK von $5 \times 10^{-2}\text{M}$ und KRB ad 5,0 ml. Zur Messung der NSAD + NAD-Synthese wurde $0,7 \mu\text{C}$ 14-C-7-NS ($5 \times 10^{-6}\text{M}$) zugesetzt. Zur Messung der DNS-Synthese wurden $2 \mu\text{C}$ 14-C-2-Thymidin ($6,6 \times 10^{-6}\text{M}$) und 0,05 ml inaktives Thymidin ($5 \times 10^{-6}\text{M}$) eingesetzt. Zur Messung der Proteinsynthese wurden $0,5 \mu\text{C}$ 14-C-L-Leucin (10^{-3}M) und 0,5 ml inaktives Leucin (10^{-4}M) zugesetzt. Die Kontrollansätze enthielten nur $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Gasphase 95 % O_2 /5 % CO_2 . Temp. 37°C , Inkubationsdauer 60 min. Die Werte ergeben sich als Mittelwerte aus den angegebenen Versuchen. Die Aufbereitung der Zellen siehe Methodik.

Dabei zeigt TAB.VII eine hemmende Wirkung von Glucose, Fructose, Mannose, 2-Desoxy-D-glucose, während Galactose, Methyl- α -D-pyranosid, 3-O-Methylpyranose, meso-Ionosit, Mannit, Maltose, Sorbose und Sorbit keinen hemmenden Einfluss auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ haben.

Aus TAB.VIII ergibt sich, dass Pentosen, Sedoheptulose, Thymidin und Uridin keinen hemmenden Einfluss auf die gemessenen Syntheseleistungen aufweisen.

Inkubationsbedingungen	n	% der Kontrolle		
		NAD-Synthese	DNS-Synthese	Protein-Synthese
D(-)-Arabinose	2	124,0	-	-
D(+)-Digitoxose	2	89,2	-	-
L(-)-Fucose	2	111,3	-	-
L(+)-Rhamnose	2	114,3	-	-
D(-)-Ribose	2	157,5	83,8	86,2
2-Desoxy-D-ribose	2	100,2	-	-
D-Sedoheptulose	2	156,5	107,7	97,9
D(+)-Xylose	2	159,6	79,1	79,2
Thymidin	2	171,6	-	-
Uridin	2	63,6	-	-

TAB.VIII Einfluss verschiedener Zucker auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese von EATZ. Die Versuchsbedingungen entsprechen den in Legende zu TAB.VII beschriebenen Versuchen.

Acetat, Äthanol, Dihydroxyaceton, Glycerin, Glycerinaldehyd, Lactat und Pyruvat, sowie die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutamin, Glycin und Leucin ergeben ebenfalls keinen wesentlichen hemmenden Einfluss auf die gemessenen NAD-, DNS- und Proteinsynthesen, wie TAB.IX zeigt.

Inkubations- bedingungen	n	% der Kontrolle		
		NAD- Synthese	DNS- Synthese	Protein- Synthese
Acetat-Na	4	101,4	-	-
Äthanol	1	105,4	-	-
Dihydroxyaceton	3	148,5	-	-
DL-Glycerinaldehyd	3	78,6	-	-
Glycerin	3	53,6	79,5	87,3
Lactat	1	131,0	80,0	81,1
Pyruvat-Na	3	64,6	56,5	48,4
Asparaginsäure	1	181,6	-	-
Glutamin	1	81,8	-	-
Glycin	2	107,5	-	-
Leucin	1	115,6	-	-

TAB.IX Einfluss von Stoffwechselmetaboliten und Aminosäuren auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthesen in EATZ. Versuchsbedingungen siehe Legende zu TAB.VII.

Ein deutlich hemmender Einfluss bei allen gemessenen Synthesen ist dagegen für Glucosamin, Gluconsäure- β -lacton und Ascorbinsäure nachzuweisen, während Glucuronsäure nur auf die DNS- und Proteinsynthese einen hemmenden Einfluss zeigt. N-Acetyl-D-Glucosamin und Galactosamin zeigen auf die gemessenen Synthesen keine hemmende Wirkung (TAB.X)(10,15,22,27).

Inkubationsbedingungen	n	% der Kontrolle		
		NAD-Synthese	DNS-Synthese	Protein-Synthese
D(+)-Glucosamin-HCl	6	10,8	12,7	7,4
N-Acetyl-D-glucosamin	4	127,7	110,2	76,9
D-Galaktosamin	3	128,2	-	-
D(+)-Gluconsäure- β -lacton	3	2,9	3,3	2,4
D-Glucuronsäure-Na	1	84,1	26,9	40,0
L(+)-Ascorbinsäure	4	2,9	2,6	4,0

TAB.X Einfluss von Amino Zucker und Zuckersäuren auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ. Versuchsbedingungen wie in Legende zu TAB.VII.

Wie TAB.XI zeigt, ist die Hemmwirkung der 2-Desoxy-D-glucose abhängig von der Senkung des ATP-Spiegels (13,16,25,32), während die durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hervorgerufene Hemmwirkung nicht allein durch einen ATP-Abfall erklärt werden kann, wie besonders in ABB.5 demonstriert wird.

Inkubationsbedingungen		IpM NSAD+NAD pro ml Zellen $\times 10^{-5}$	%	ATP-Gehalt mMol ATP pro ml Zellen
Glucose	2-DOG			
10^{-2} M	—	1,46	100	933
$7,5 \times 10^{-3}$ M	$2,5 \times 10^{-3}$ M	0,95	65	660
5×10^{-3} M	5×10^{-3} M	0,38	26	228
$2,5 \times 10^{-3}$ M	$7,5 \times 10^{-3}$ M	0,13	9	97
—	$\times 10^{-2}$ M	0,03	2	40
10^{-2} M + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($7,5 \times 10^{-3}$ M)	—	0,25	17	630

TAB.XI Einfluss steigender Konzentrationen von 2-Desoxy-D-glucose auf den ATP-Gehalt und die NAD-Synthese in EATZ. Versuchsbedingungen und Aufbereitung der Zellen siehe unter METHODEN.

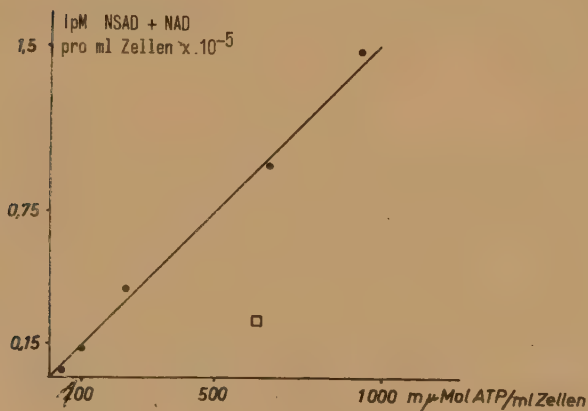


ABB.5 Abhängigkeit der NAD-Synthese von dem ATP-Gehalt in EATZ. Die in TAB.XI gemessene NAD-Synthese wurde gegen den ATP-Gehalt der Zellen aufgetragen.
● - ● Glucose + 2-DOG; □ Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ähnliches gilt für die beobachtete Hemmwirkung von Glucosamin, welches auch ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zusatz hemmen kann (TAB.VIII) und sich somit bereits deutlich von der Wirkung der Glucose unterscheidet (10,15, 23,27,30). Da, wie bereits bekannt, Glucosamin spontan aus Glucose und NH_4^+ -Salzen entstehen kann (12), wurde zunächst geprüft, in wie weit unter unseren Inkubationsbedingungen freies Glucosamin entstehen und somit eventuell für den gezeigten hemmenden Einfluss verantwortlich sein könnte.

TAB.XII zeigt, dass mit und ohne EATZ messbare Mengen von Glucosamin entstehen, die jedoch in einer so geringen Konzentration (10^{-3}M) vorhanden sind, dass ein Glucosamin-Einfluss praktisch ausgeschlossen werden kann.

Inkubations- bedingungen	Glucosamin-Konz. in 10^{-3} mg/ml
A) ohne EATZ	
1) Kontrolle	1
2) Glucose	46
3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3
4) Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	153
B) mit EATZ	
1) Kontrolle	98
2) Glucose	177
3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	95
4) Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	183

TAB.XII Bildung von Glucosamin und Glucose+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unter Inkubationsbedingungen mit und ohne EATZ. Die Kontrolle enthielt nur KRB. Die EK der oben angeführten Substanzen und die Zellkonzentrationen entsprechen den in der Methodik beschriebenen Standardbedingungen. Zur Messung nach der Methode von MORGAN und ELSON wurde 0,1 ml des zentrifugierten Überstandes eingesetzt.

In dem in TAB.XIII dargestellten Versuch kommt es nach Zusatz von Glucosamin zu einem deutlichen ATP-Abfall gegenüber der Kontrolle, der für die Hemmwirkung verantwortlich sein dürfte, da nach Zusatz von Glucose sowohl der ATP-Spiegel angehoben als auch die Hemmung aufgehoben wird (7,30).

Inkubations- bedingungen	n	dpm NSAD+NAD pro ml Zellen $\times 10^{-6}$	% der Kontrolle	ATP-Gehalt mmol ATP pro ml Zellen
Kontrolle	2	1,0	-	750
Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	0,12	12	1102,1
Glucosamin-HCl	2	0,16	16	341,7
Glucosamin-HCl +Glucose (10^{-2}M)	2	1,48	148	2541,7

TAB.XIII Einfluss von Glucosamin und Glucosamin + Glucose auf die NAD-Synthese und den ATP-Gehalt in EATZ. Die Zellkonzentration betrug 0,4 ml pro Ansatz, die Glucosaminkonzentration entsprach einer EK von $5 \times 10^{-3}\text{M}$. Die Kontrolle enthielt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Im übrigen entsprachen die Versuchsbedingungen den in METHODEN beschriebenen Standardbedingungen.

Da unter Inkubationsbedingungen von Glucose + Glucosamin die höchsten ATP-Spiegel und eine gegenüber der Kontrolle um 50 % erhöhte NAD-Synthese gemessen wurde (TAB.XIII), haben wir in einem weiteren Versuch geprüft, ob Glucosamin auch die Glucose-Hemmung wieder aufheben kann.

Wie TAB.XIV zeigt, führen steigende Glucosamin-konzentrationen zu einem geringen Anheben des ATP-Spiegels und zu einer mässigen aber konzentrations-abhängigen Aufhebung der Hemmung durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30).

Versuch	Glucosamin-HCl	dpm NSAD+NAD pro ml Zellen $\times 10^{-6}$	% der Kontrolle	ATP-Gehalt % der Kontrolle
Kontrolle	-	1,85	-	-
Glucose $5 \times 10^{-2} \text{M}$ + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	-	0,21	11,5	226,8
Glucose $5 \times 10^{-2} \text{M}$ + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	10^{-2}M	0,31	16,7	243,3
	$2,5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,64	34,7	244,0
	$5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,84	45,6	247,4
Glucose 10^{-1}M + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	10^{-2}M	0,35	19,0	216,5
	$2,5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,40	21,5	224,7
	$5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,65	35,3	255,7

TAB.XIV Einfluss steigender Glucosaminkonzentrationen auf durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gehemmte EATZ. Die Versuchsbedingungen entsprachen den Standardbedingungen. Die Kontrolle enthielt kein $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Aus diesem Versuch ergibt sich die Frage, ob noch andere Substanzen, die für sich allein unter Standard-Inkubationsbedingungen eine Stimulierung der NAD-Synthese bewirken, - Sorbose (TAB.VII), Ribose, Sedoheptulose und Xylose (TAB.VIII) - die Hemmwirkung von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und anderen hemmenden Zuckern wieder aufheben können.

Wie TAB.XV zeigt, ergibt sich keine Aufhebung der Hemmung durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei Zusatz von Ribose, Sorbose, Sedoheptulose und Xylose. Auch der hemmende Einfluss von Glucosamin (TAB.X), Gluconlacton + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (TAB.X), Glucuronsäure + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (TAB.X), Glycerin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (TAB.IX), Mannose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (TAB.VII) und Pyruvat + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnte durch Sedoheptulose-Zusatz nicht aufgehoben werden.

Inkubationsbedingungen	% der Kontrolle		
	NAD-Synthese	DNS-Synthese	Protein-Synthese
Glucose	14,02	14,2	10,1
+Ribose	2,1	-	-
+Sorbose	4,3	-	-
+Sedoheptulose	10,3	13,5	28,9
+Xylose	2,02	-	-
Glucosamin-HCl	-	12,7	7,4
+Sedoheptulose	-	14,0	6,9
Gluconsäure- δ -lacton	-	0,85	0,49
+Sedoheptulose	-	0,81	0,52
Glucuronsäure-Na	84,1	26,9	36,0
+Glucose	7,4	9,3	20,1
Glycerin	-	79,5	87,3
+Sedoheptulose	-	69,6	48,1
Mannose	-	4,64	4,3
+Sedoheptulose	-	5,5	5,0
Pyruvat-Na	-	56,5	48,4
+Sedoheptulose	-	43,1	22,2

TAB.XV Einfluss verschiedener Zucker auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in gehemmten EATZ. Die Ansätze enthielten alle ausser den angegebenen Zuckern noch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einer EK von 10^{-2}M . Sonst entsprachen die Versuchsbedingungen den in Legende zu TAB.VII beschriebenen Versuchen.

Wird die Hemmwirkung von Fructose auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese näher untersucht, - TAB.VII ergab eine deutlich gehemmte NAD-, DNS- und Proteinsynthese bei Fructose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - so zeigt sich, dass ähnlich wie bei Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (TAB.VII), in der hohen Konzentration von $5 \times 10^{-2}\text{M}$ Fructose alle drei gemessenen Synthesen deutlich gehemmt sind (4,29,31,32) und diese Hemmung mit abnehmen der Fructosekonzentration praktisch vollständig zurückgeht. Ohne Zusatz von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist der hemmende Einfluss von Fructose nur gering (TAB.XVI).

Inkubationsbedingungen	% der Kontrolle		
	NAD-Synthese	DNS-Synthese	Protein-Synthese
D(-)-Fructose			
a) ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
$5 \times 10^{-2}\text{ M}$	138,8	55,8	45,6
$5 \times 10^{-3}\text{ M}$	139,5	63,2	42,5
$5 \times 10^{-4}\text{ M}$	123,5	85,7	53,6
b) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
$5 \times 10^{-2}\text{ M}$	9,6	21,7	9,9
$5 \times 10^{-3}\text{ M}$	190,2	77,2	56,9
$5 \times 10^{-4}\text{ M}$	87,9	78,2	42,0

TAB.XVI Einfluss von D-Fructose mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ. Versuchsbedingungen wie in Legende zu TAB.VII.

Ein ähnlicher Effekt ergibt sich für die Inkubation von Mannose (TAB.VII), wobei die hemmende Wirkung bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zusatz deutlich grösser ist als ohne (4,31). Besonders auffällig ist hierbei, dass noch in einer Konzentration von $5 \times 10^{-3}\text{M}$ Mannose praktisch alle Synthesen gehemmt bleiben (TAB.XVII) !

Inkubations- bedingungen	% der Kontrolle		
	NAD- Synthese	DNS- Synthese	Protein- Synthese
D - Mannose			
a) ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
$5 \times 10^{-2}\text{M}$	71,4	47,9	72,7
$5 \times 10^{-3}\text{M}$	89,0	54,6	57,9
$5 \times 10^{-4}\text{M}$	154,9	79,7	91,3
b) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
$5 \times 10^{-2}\text{M}$	4,2	3,8	9,3
$5 \times 10^{-3}\text{M}$	5,3	9,7	9,8
$5 \times 10^{-4}\text{M}$	158,0	80,6	88,0

TAB.XVII Einfluss von D-Mannose mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ. Versuchsbedingungen siehe TAB.VII.

Wie TAB.XVIII zeigt, lässt sich der hemmende Einfluss von Gluconsäure- δ -lacton (TAB.X) lediglich bei Anwesenheit von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nachweisen. Konzentrationen unter $5 \times 10^{-2}\text{M}$ Gluconsäure- δ -lacton haben wie bei den anderen geprüften Zuckern keine Hemmwirkung.

Inkubations- bedingungen	% der Kontrolle		
	NAD- Synthese	DNS- Synthese	Protein- Synthese
D(+)-Gluconsäure- δ -lacton			
a) ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
5 x 10^{-2}M	93,2	84,2	35,9
5 x 10^{-3}M	125,3	101,0	104,5
5 x 10^{-4}M	117,1	97,2	105,4
b) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
5 x 10^{-2}M	2,9	5,8	4,3
5 x 10^{-3}M	-	82,6	59,5
5 x 10^{-4}M	-	57,2	41,2

TAB.XVIII Einfluss von D-Gluconsäure- δ -lacton mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ. Die Versuchsbedingungen entsprechen den in TAB.VII beschriebenen Versuchen.

Glucuronsäure hemmt mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-2}\text{M}$ nur die DNS- und Proteinsynthese (siehe auch TAB.X). Bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-3}\text{M}$ Glucuronsäure ist kein hemmender Einfluss mehr nachweisbar (TAB.XIX).

Inkubations- bedingungen	% der Kontrolle		
	NAD- Synthese	DNS- Synthese	Protein- Synthese
D-Glucuronsäure-Na			
a) ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
5 x 10^{-2} M	82,4	26,1	35,5
5 x 10^{-3} M	97,7	86,2	88,4
5 x 10^{-4} M	102,7	86,5	104,9
b) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
5 x 10^{-2} M	84,1	26,9	40,0
5 x 10^{-3} M	99,9	82,2	80,3
5 x 10^{-4} M	107,1	106,6	89,5

TAB.XIX Einfluss von D-Glucuronsäure mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ.-Versuchsbedingungen siehe TAB.VII.

Ascorbinsäure führt mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einer Konzentration von 5×10^{-2} M zu einer deutlichen Hemmung sämtlicher Synthesen (TAB.X), wobei in Kombination mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auch noch bei einer Konzentration von 5×10^{-3} M Ascorbinsäure ein hemmender Effekt auf die DNS- und Proteinsynthese nachweisbar ist (TAB.XX).

Inkubations- bedingungen	% der Kontrolle		
	NAD- Synthese	DNS- Synthese	Protein- Synthese
L(+)-Ascorbinsäure			
a) ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
5 x 10^{-2} M	20,2	2,7	5,9
5 x 10^{-3} M	100,5	40,7	64,4
5 x 10^{-4} M	91,2	97,8	87,7
b) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
5 x 10^{-2} M	2,1	2,6	4,0
5 x 10^{-3} M	71,9	26,2	49,7
5 x 10^{-4} M	82,0	74,1	85,7

TAB.XX Einfluss von Ascorbinsäure mit und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ. Die Ansätze enthielten 0,2 ml Zellen, sonst entsprachen die Versuchsbedingungen den in Legende zu TAB.VII beschriebenen Versuchen.

Bestätigt wurden diese Versuche durch Transplantationsversuche, die gezeigt haben, dass diejenigen Zellen, die in vitro durch Zusatz verschiedener Zucker deutlich gehemmte Synthesen zeigten, nicht mehr transplantierbar waren.

Wie TAB.XXI zeigt, ergibt sich bei entsprechend hoch gewählter Zellkonzentration ein Nichtanwachsen des Tumors bei mit Fructose +, Mannose +, Vit.C+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vorbehandelten Zellen, während die mit Glucosamin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ behandelten Zellen wieder anwachsen.

Inkubationsbedingungen		ml Zellen pro ml	Überimpferfolg
Mannose	$5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10^{-2}M		
Fructose	$5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10^{-2}M		
Ascorbinsäure	$5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10^{-2}M		
Ascorbinsäure	$5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
Glucosamin-HCl	$5 \times 10^{-2} \text{M}$	0,187	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet
+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10^{-2}M		

TAB.XXI Transplantierbarkeit von EATZ nach Vorinkubation mit Mannose +, Fructose +, Ascorbinsäure +, und Glucosamin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Versuchsbedingungen und Weiterbehandlung der Zellen siehe unter METHODEN.

D. Einfluss von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf Human-Leukozyten, Vogel-Erythrozyten und Ratten-leberzellen.

Ergänzende Versuche zur Tumorspezifität der durch Zucker mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zusatz ausgelösten Hemmwirkung der verschiedenen Synthesen werden in TAB.XXII aufgezeigt. Bei Vogel-Erythrozyten vom Huhn lässt sich durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nur bei der NAD-Synthese ein hemmender Effekt nachweisen.

Bei Inkubation von Rattenleberschnitten mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zeigt sich nur eine gering ausgeprägte Hemmwirkung auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese.

Kein hemmender Effekt zeigt sich bei Inkubation von Human-Leukozyten mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Zellart	Inkubations- bedingungen	n	% der Kontrolle		
			NAD- Synthese	DNS- Synthese	Protein- Synthese
Human- Leukozyten	Glucose	5	-	-	126,0
	$+(NH_4)_2SO_4$				
Vogel- Erythrozyten (Huhn)	Glucose	1	15,6	-	104,6
	$+(NH_4)_2SO_4$				
Rattenleber	Glucose	4	63,7	79,4	90,8
	$+(NH_4)_2SO_4$				

TAB.XXII Einfluss von Glucose + $(NH_4)_2SO_4$ auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in Human-Leukozyten, Vogel-Erythrozyten und Rattenleberschnitten. Die Humanleukozyten-Ansätze enthielten 0,07 ml Zellen, Glucose in einer EK von $5 \times 10^{-2}M$, $(NH_4)_2SO_4$ ($10^{-2}M$), $1 \mu C$ 14-C-L-Leucin (EK $2 \times 10^{-5}M$) und inaktives Leucin (EK $10^{-4}M$). Die Kontrolle enthielt kein $(NH_4)_2SO_4$. Die Vogel-Erythrozyten-Ansätze enthielten 0,2 ml Zellen, 0,2 ml Albumin, Glucose in oben angegebener Konzentration, $1 \mu C$ 14-C-7-NS (EK $4 \times 10^{-5}M$). Kontrolle ohne $(NH_4)_2SO_4$. Die Rattenleberschnitten-Ansätze enthielten 50 mg Rattenleber-Feuchgewicht, Glucose und $(NH_4)_2SO_4$ in oben angegebener Konzentration, $0,7 \mu C$ 14-C-7-NS (EK $5 \times 10^{-6}M$), $2 \mu C$ 14-C-2-Thymidin (EK $6,6 \times 10^{-6}M$), inaktives Thymidin (EK $5 \times 10^{-6}M$), $1 \mu C$ 14-C-L-Leucin (EK $2 \times 10^{-5}M$), inaktives Leucin (EK $10^{-4}M$) und KRB ad 5,0 ml Volumen. Gasphase 95 % O_2 / 5 % CO_2 , Temp. $37^\circ C$, Inkubationsdauer 60 min. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte wie in METHODEN beschrieben.

TAB. XXIII bringt zusammenfassend die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Eine in vitro nachweisbare Synthesehemmung der NAD-, DNS- und Proteinsynthese durch Glucose +, Fructose +, Mannose +, Ascorbinsäure $\pm$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, wurde auch in vivo durch die nicht mehr mögliche Transplantierbarkeit des Tumors bei hoher Zellkonzentration in der Vorinkubation korreliert. Lediglich bei Glucosamin $+(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zeigt sich der Tumor transplantierbar, obwohl auch hier in vitro alle gemessenen Synthesen deutlich gehemmt waren.

Inkubationsbedingungen	n	% der Kontrolle			ml Zellen pro ml	Überimpferfolg
		NAD-Synthese	DNS-Synthese	Protein-Synthese		
Kontrolle	17	-	-	-	0,026 0,053 0,147 0,173 0,187	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet
D-Glucose $5 \times 10^{-2}\text{M}$ $+(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	17	14,04	14,2	10,1	0,026 0,053 0,147 0,173 0,187	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet alle Tiere überlebten kein Ascites
D-Fructose $5 \times 10^{-2}\text{M}$ $+(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	4	24,5	21,7	9,9	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
D-Mannose $5 \times 10^{-2}\text{M}$ $+(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	2	7,1	4,6	4,3	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
L-Ascorbinsäure $5 \times 10^{-2}\text{M}$ $+(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	4	2,9	2,6	4,0	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
L-Ascorbinsäure $5 \times 10^{-2}\text{M}$	1	20,9	2,7	5,9	0,187	alle Tiere überlebten kein Ascites
D-Glucosamin-HCl $5 \times 10^{-2}\text{M}$ $+(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10^{-2}M	6	10,8	12,7	7,4	0,187	alle Tiere gestorben oder wegen Ascites getötet

TAB. XXIII Einfluss verschiedener Zucker auf die NAD-, DNS- und Proteinsynthese in EATZ und ihre Transplantierbarkeit nach 2-stündiger Vorinkubation. Die Versuchsbedingungen entsprechen den in Legende zu TAB. II und TAB. XXI beschriebenen Versuchen.

IV DISKUSSION

In Übereinstimmung mit der vorhergehenden Arbeit, in der die NAD-, DNS- und Proteinsynthese von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durch Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in vitro gehemmt werden (3), zeigen auch unsere ersten Versuche durch eine 2-stündige Vorinkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine Hemmung der NAD-Synthese in den ersten 30 min ; darauf synthetisieren die Zellen wieder normal NAD (ABB.1). Eine Aufhebung der Transplantierbarkeit der Zellen lässt sich nicht nachweisen (TAB.I). Da wir in diesen Versuchen eine Mutation der Zellen nicht ausschliessen konnten, zumal diese ausserordentlich schleimbildend wuchsen, wurden weiterführende Versuche an einem frischen Tumortransplantat durchgeführt. Bei der Untersuchung dieser Zellen zeigte sich eine irreversibel gehemmte NAD-Synthese, wenn eine Zellkonzentration über 10 % im Ansatz gewählt wurde (ABB.2). Vor allen Dingen liess sich in diesen Versuchen bei entsprechend hoch gewählter Zellkonzentration im Ansatz ein Nichtangehen des Tumors nachweisen (TAB.II). Zusätzlich muss aber wohl die Zellart selbst eine Bedeutung haben, da die schleimbildenden Zellen (ABB.1) nach Resuspendierung in ein neutrales Medium nach 30 min Lag-Phase wieder völlig

normal NAD synthetisieren. Wie aus ABB.3 hervorgeht, ist dies bei dem frischen Tumor selbst dann nicht der Fall, wenn die Zellkonzentration in der Vorinkubation niedrig gewählt wurde ; nach Resuspendierung der Zellen bleibt die NAD-Synthese zu etwa 50 % gehemmt und normalisiert sich nicht vollständig. Die Kurve in ABB.3 verläuft nicht parallel (vgl.ABB.1). Die Frage, ob Glucose selbst oder ein Metabolit der Glucose für die cytostatische Wirkung von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verantwortlich ist, muss nach den Untersuchungen in ABB.4 und den TAB.III-X dahingehend beantwortet werden, dass Glucose selbst kaum für den cytostatischen Effekt verantwortlich ist. ABB.4 zeigt nur, dass die Hemmung der NAD-Synthese bereits 60 sec nach Inkubationsbeginn nachweisbar ist, was eher für eine Hemmung durch Glucose selber sprechen würde, aber die Versuche in TAB.IV und TAB.V zeigen bereits, dass Inkubationsansätze mit niedriger Glucosekonzentration ebenfalls einen deutlich hemmenden Einfluss haben, der sogar zum Teil stärker ausgeprägt ist, wie TAB.V zeigt. TAB. VII-X zeigen endgültig, dass Glucose durch Fructose, Mannose, Glucosamin, Glucuronsäure- β -lacton und Ascorbinsäure in ihrer Wirkung ersetzt werden kann, wobei darauf hinzuweisen ist, dass mit Fructose und Mannose nur Zucker hemmend wirken, die wie auch

Glucose glykolyisiert werden können (4,8,10,20,22, 23,24,30,31,32). Eine geringe Säuerung des Mediums durch die glykolyisierbaren Zucker, auf deren Bedeutung für die Tumor-Therapie besonders v.Ardenne (1) hingewiesen hat, ist zwar durch pH-Messungen vor und nach der Inkubation nachzuweisen, dürfte jedoch ohne Einfluss auf die gemessenen Syntheseleistungen und die Transplantierbarkeit sein, da bei Inkubation in Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer das intrazelluläre pH sich kaum ändert (22). Bestätigt wird dies auch durch den Versuch in ABB.4, in dem eine Hemmung der NAD-Synthese nach 60 sec nachweisbar ist, wobei sich in dieser kurzen Zeit keine pH-Änderungen nachweisen lassen.

Besonders interessant ist die ausgeprägte Hemmung der Syntheseleistungen durch Mannose (TAB.VII und TAB.XVII), die noch bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ hemmen kann, was bei Fructose (TAB.XVI) nicht möglich ist, aber im Gegensatz zu Glucuronsäure (TAB.XIX) und Ascorbinsäure (TAB.XX) auf den Zusatz von NH_4^+ -Ionen angewiesen ist. Glucuronsäure und Ascorbinsäure hemmen mit und ohne Zusatz von NH_4 -Ionen praktisch gleich gut.

Die Hemmung der Syntheseleistungen durch 2-DOG und Glucosamin müssen gesondert betrachtet werden, da sie einmal ohne NH_4 -Ionen-Zusatz auftreten kann

und zum anderen ein erheblicher ATP-Abfall in den untersuchten EATZ zu beobachten ist, was nach Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Zusatz nicht der Fall ist (TAB.XI, ABB.5 und TAB.XIII).

Die Hemmung der NAD-Synthese in diesen Versuchen ist also gut durch einen ATP-Abfall zu erklären (13,16,23,25,32); sie stellt einen deutlich anderen Hemmtyp dar, als ^{oder} bei Inkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu beobachten ist. Dafür spricht auch das Ergebnis des Überimpfversuchs (TAB.XXI und TAB.XXIII) in dem trotz gehemmter NAD-Synthese die Zellen durch die Vorinkubation mit Glucosamin nicht vollständig abgetötet worden sind, sondern nach Transplantation wieder anwachsen. Dem entsprechen auch Untersuchungen anderer Autoren, die zwar in vitro ebenfalls einen deutlichen cytostatischen Effekt durch Glucosamin fanden, der sich aber in Transplantationsversuchen nicht als wirksam erwies (10,15,27,30).

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob evtl. andere Zucker als die bereits vorher untersuchte Glucose (3,4,23,29,31) allein oder in Gegenwart von NH_4 -Ionen einen stärkeren cytostatischen Einfluss ausüben können. Dies lässt sich zumindest graduell für die Zucker Mannose, Gluconsäure- δ -lacton, Glucuronsäure und Ascorbinsäure (TAB.XVIII-XX) nachweisen. Die Hemmwirkungen von Glucuronsäure und Ascorbinsäure (TAB.XIX und XX)

sind besonders interessant, da sie auch ohne Anwesenheit von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nachzuweisen sind, wobei Ascorbinsäure auch noch in geringerer Konzentration von $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ deutlich hemmende Eigenschaften auf die DNS und Proteinsynthese der untersuchten Zellen aufweist; ebenso sind die Tumorzellen nach Vorinkubation mit Ascorbinsäure allein und in Gegenwart von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nicht mehr transplantierbar. Beobachtungen über einen cytostatischen Einfluss von Ascorbinsäure im Tierversuch und bei Tumoren am Menschen liegen vor (11,14,18). Heise, Lührs und Neunhoeffter (11) diskutieren als Wirkungsmöglichkeit der Ascorbinsäure eine Herabsetzung der aeroben Glykolyse durch Eröffnung einer zusätzlichen Atmungskette. In den Untersuchungen wurde durch Zugabe von Dehydroascorbinsäure die Glykolyse um 34 - 68 % gehemmt und die Atmung um 42 % gesteigert (18).

Die hier vorgelegten Untersuchungen sagen nichts darüber aus, ob ein ähnlicher Mechanismus der beobachteten Hemmung der NAD-, DNS- und Proteinsynthese zugrunde liegt. Eine Säuerung des Inkubationsmediums, wie sie von Klinger und Mitarbeiter (14) als Ursache des cytostatischen Effekts von Ascorbinsäure angesehen wurde, lag in unseren Versuchen nicht vor.

Über cytostatische Wirkungen von Gluconsäure- γ -lacton und von Glucuronsäure sind uns keine Voruntersuchungen bekannt. Der in unseren Untersuchungen

nachgewiesene cytostatische Einfluss dieser Zucker muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden, ehe über die Wirkung dieser Zucker diskutiert werden kann.

Prinzipiell bestätigt werden unsere Befunde auch noch von anderen Autoren. Mallick, Banerjee und Shrivastan (19) versuchen den hemmenden Einfluss von Glucose auf das Tumorstoffwechselwachstum in Mäusen dadurch zu erklären, dass durch Glucose-Fütterung eine leichte Hyperglykämie im Mäuseorganismus erreicht wird, die einen stärkeren Verbrauch des Glutamins durch den Tumor verhindert, welches als essentieller Wachstumsfaktor bekannt ist. W.H.Garvie (6) stellte eine gegenseitige günstige Beeinflussung von Tumorstoffwechselwachstum und Diabetes mellitus fest. Durch Cortison induzierter Diabetes mellitus wird bei tumortragenden Mäusen gebessert. Eine durch Alloxan-Diabetes erzeugte Hyperglykämie vermindert die Wachstumsrate eines soliden Tumors signifikant. Eine Hyperglykämie, hervorgerufen durch eine i.v. Glucose-Applikation, beschränkt das Ausmass der pulmonalen Metastasierung von i.v. injizierten Tumorzellen und verhindert das Anwachsen der Tumorzellen in anderen Organen. Als Ursache dieses cytostatischen Effektes von Glucose wird ein direkter Einfluss von Glucose auf den Tumorstoffwechsel oder eine besondere Abwehrbereitschaft des tumortragenden Mäuseorganismus bei Hyperglykämie diskutiert.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass sich in EATZ durch Inkubation mit Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wichtige Syntheseleistungen (NAD-, DNS- und Proteinsynthese) irreversibel schädigen lassen. Die Zellen verlieren ihre Transplantierbarkeit.

Eine Hemmung der NAD-Synthese ist zwar bereits 60 sec nach Zusatz von Glucose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nachweisbar, jedoch ist das Ausmass der Hemmung nicht von der Glucosekonzentration abhängig. Zusätzlich lässt sich die Wirkung der Glucose sowohl was die Hemmung der Syntheseleistungen in vitro als auch was die Transplantierbarkeit der Zellen in vivo angeht, durch die Zucker Fructose, Mannose, Glucosäure- γ -lacton und Ascorbinsäure ersetzen.

Andere Zucker (Galaktose, Sorbose, Sorbit etc.) haben bei gleicher Konzentration im Inkubationsansatz keine hemmenden Wirkungen auf die gemessenen Syntheseleistungen der EATZ in vitro.

Glucosamin hemmt zwar die Syntheseleistungen von EATZ in vitro, hebt aber die Transplantierbarkeit der Zellen nicht auf. Die Hemmung der Syntheseleistungen durch Glucosamin in vitro wird auf eine ATP-Senkung (ähnlich dem Hemmtyp durch 2-DOG) in den Zellen zurückgeführt; sie ist durch Zusatz von

Glucose aufzuheben. Ein unspezifisch toxischer Effekt hemmender Zucker ist auszuschliessen, da die Syntheseleistungen von Human-Leukozyten, Vogel-Erythrozyten und Rattenleberschnitten nicht beeinflusst werden. Die Ergebnisse werden diskutiert.

IV LITERATUR

- (1) v.ARDENNE, M., R.A.CHAPLAIN und P.G.RAITNAUER:
Selektive Krebszellschädigung durch eine
Attackenkombination mit Übersäuerung, Hyper-
thermie, Vitamin A, Dimethylsulfoxyd und
weiteren die Freisetzung lysosomaler Enzyme
fördernde Agenzien.
Arch.Geschwulstforschg.33, im Druck, 1969
- (2) BORSOOK, H., C.L.DEASY, A.J. HAAGEN-SMIT,
H. KEIGHLEY and P.H. LOWY : Incorporation in
vitro of labeled amino-acids into the proteins
of rabbit reticulocytes.
J. Biol. Chem. 196, 669 (1952)
- (3) BRACHTEL, D. : Einfluss von Glucose und Ammonium-
sulfat auf energieliefernde Prozesse und Synthe-
seleistungen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
in vitro.
Dissertation an der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Giessen 1967
- (4) BRIN, M. and R.W. Mc KEE : The inhibition of
respiration by glucose, fructose, mannose in
the Ehrlich mouse ascites tumour
Cancer Research 16, 364 (1956)
- (5) FRANZ, I.D. jr., R.B. LOFTFIELD and W.W.MILLER :
Incorporation of ^{14}C from carboxyllabeled
DL-alanin into the proteins of liver slices.
Science 106, 544 (1947)
- (6) GARVIE, W.H. : The Influence of Alloxan-Diabetes
on Experimental Cancer.
British Journal Cancer 22, No 1, 128-32 (1968)

- (7) GÜNTHER, Th., M. WENZEL und H. GREILING
Zum Stoffwechsel des Glucosamins in Ascites-
tumorzellen.
II. Der intracelluläre Umsatz des Glucosamin.
Hoppe-Seylers Z.physiol. Chem. 326, 212 (1961)
- (8) GRAFF, S., H. MOSER, O.KASTNER, A.M.GRAFF and
M.TANNENBAUM : The Significance of Glycolysis.
J. Nation. Cancer Inst. Vol. 34, 511 (1965)
- (9) GRUNICKE, H., M. LIERSCH, M. HINZ, B.PUSCHENDORF,
E. RICHTER und H. HOLZER : Die Bedeutung des
Nicotinsäureamids für die Synthese des NAD in
Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Biochem. Biophys. Acta 121, 228 (1966)
- (10) HANO, K., S. MATSUI und Y. NISHINO : Untersuchun-
gen über die geschwulsthemmende Wirkung verschiede-
ner Aminosucker.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 65, 425 (1963)
- (11) HEISE, E., W. LÜHRS und O. NEUNHOEFFER : Der
Einfluss von Dehydroascorbinsäure auf den Tumor-
stoffwechsel.
Naturwissenschaften 44, 425 (1957)
- (12) HEYNS, K., und K. MEINECKE : B.86, 1453 (1953)
zitiert aus :
Hoppe-Seyler/Thierfelder : Bausteine des Tier-
körpers III₁, 764 (1955)
- (13) IBSEN, K.H., COE, E. , and Mc KEE, R.W. : Some
Factors Influencing Respiration and Glycolysis
in Ehrlich-Ascites-Tumour-Cells.
Cancer Research 20, 1399 (1960)

- (14) KLINGER, W., H. KLINGER, and L.KERSTEN :
The effect of L-ascorbid acid on Ehrlich ascites carcinoma and Yoshida sarcoma in vitro and in vivo.
Acta Biol. Med. German 8, 53 (1962)

- (15) LINDNER, I., K. BECKER und H.A. v. SCHWEINITZ :
Über die geschwulsthemmende Wirkung von Grund-
substanzbestandteilen. II.Mitteilungen. Stoff-
wechseluntersuchungen.
Klin.Wschr. 38, 763 (1960)

- (16) LETNANSKY, K., und F. SEELICH : Über die Beein-
flussung von Reaktionen des Citronensäure-Cyclus
durch 2-Desoxyglucose. Untersuchungen an Zellen
des Ehrlich-Ascitescarcinoms der Maus.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 64 , 1-6 (1960)

- (17) LETNANSKY, K. : Biochem. biophys. Acta 87,1 (1964)
zitiert nach (23)

- (18) LÜHRS, W., und G. BACIGALUPO : Tierexperimenteller
und klinischer Versuch über die Beeinflussung
des Tumors durch Dehydroascorbinsäure.
Ärztl. Forschung II 57 (1959)

- (19) MALLICK, L., S.K. BANERJEE and G.C. SHRIVASTAVA :
Effects of Glucose Feeding on Tumour Development
in vivo.
British Journal Cancer 22, No 1 , 110 (1968)

- (20) MERKER, H.J., T. GUNTHER und H.GREILING :
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ascites-
tumorzellen beim Grabtree-Effekt.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 63, 481 (1960)

- (21) MORGAN und ELSON : Biochem. Journal 27, 1824 (1933)
- (22) POOLIE, D. : Intracellular pH of the Ehrlich-Ascites-Tumor-Cell as it is affected by Sugars and Sugar Derivates.
Journal of biol. Chem. 16, 3731 (1967)
- (23) PÜTTER, J. : Der Glucosestoffwechsel bei bösartigen Tumoren.
Sonderdruck aus GBK-Mitteilungsdienst B.4, Nr.6, 677 , Oktober 1967
- (24) RACKER, E : Carbohydrate Metabolism in Ascites Tumor-Cells.
Ann. N.Y. Acad.Sci.63, 1017 (1956)
- (25) RAM, D., H.S. KALNER und L. BLOCK-FRANKENTHAL : Inducer of the Grabtree Effect and its realease Uncouplers and other Agends.
Cancer Research 23, 600 (1963)
- (26) REICHARD, P. and B. ESTBORN : J. Biol. Chem. 188, 839 (1951)
Zitiert nach (28)
- (27) v.SCHEINITZ, H.A., I.LINDNER und G.FREITAG : Über die geschwulsthemmende Wirkung von Grundsubstanzbestandteilen (insbesondere von Glucosaminhydrochlorid).
Klin. Wschr. 37, 610 (1959)
- (28) SCHWIEGK, H. und F. TARBE : Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie.
Springer Verlag 1961

- (29) SEELICH, F., W. WEIGERT und K.LETNANSKY : Über die endogene Atmung von Ehrlich-Ascitestumorzellen und deren Beeinflussung durch Glucose und Fructose.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 61, 368 (1956)
- (30) VOSS, H., K. BECKER und I.LINDNER : Über die geschwulsthemmende Wirkung von Grundsatzbestandteilen.
VI. Mitteilungen. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluss von Glucosamin auf den Stoffwechsel des Ratten-Yoshida und Ehrlich-Mäuse-Ascitestumors.
Zeitschr. f.Krebsforsch. 65, 228 (1962/63)
- (31) YUSHOK, W.D. : Metabolism of Ascites Tumor Cells. Rate of Glycolysis and competitive Utilization of Fructose, Mannose and Glucose.
Cancer Research 19, 104 (1959)
- (32) YUSHOK, W. D. : Metabolism of Ascites Tumor Cells. II Inhibition of Respiration by Glycolyzable and Nonglycolyzable Sugars Phosphorylated by Hexokinase.
Cancer Research 24, 187 (1964)



VII LEBENSLAUF

Am 10. Mai 1940 wurde ich in Darmstadt geboren. Die Einschulung erfolgte im Herbst 1947 in Grossen-Buseck. Ostern 1962 schloss ich die Schulausbildung mit der Reifeprüfung an der Weidigschule, Gymnasium, Butzbach/Hessen ab. Nach Beendigung einer 2-jährigen Wehrdienstzeit in der Bundeswehr erfolgte die Immatrikulation an der Justus Liebig-Universität im April 1964 mit dem Studienfach Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im Oktober 1966 ab und nach sechs klinischen Semestern habe ich das Studium der Medizin am 26.01.1970 mit der ärztlichen Prüfung abgeschlossen.

Foto-Druck
Chemoprint OHG.
Gießen